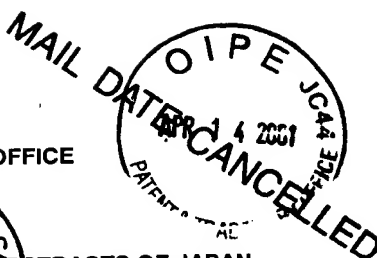


(19)



JAPANESE PATENT OFFICE



ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **04325092 A**

(43) Date of publication of application: **13.11.92**

(51) Int. Cl

C12N 15/10

(21) Application number: **03122479**

(22) Date of filing: **24.04.91**

(71) Applicant: **SUMITOMO ELECTRIC IND LTD**

(72) Inventor: **TSURUI HIRONORI
KISHIMOTO TOSHIHIKO**

(54) **SEPARATING NUCLEIC ACID**

(57) Abstract:

PURPOSE: To separate and recover specific several single-stranded nucleic acids from a mixed solution of various kinds of nucleic acids at one time.

CONSTITUTION: Single-stranded nucleic acids having different base sequences are immobilized to each of plural separable kinds of substrates to give immobilized nucleic acids, which are brought into contact with a

mixed solution of specimen and nucleic acid and a hybrid is formed from each of the immobilized nucleic acid and a single-stranded nucleic acid having a base sequence complementary to the immobilized nucleic acid in the mixed solution to give a method of separating nucleic acids. After formation of the hybrid, each substrate is separated and the single-stranded nucleic acid having the complementary base sequence is separated and recovered.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-325092

(43) 公開日 平成4年(1992)11月13日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/10		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数2(全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平3-122479	(71) 出願人	000002130 住友電気工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号
(22) 出願日	平成3年(1991)4月24日	(72) 発明者	鶴井 博理 東京都文京区本郷5-29-12-508 順天 堂大学医学部内
		(72) 発明者	片本 利彦 大阪府大阪市此花区島屋一丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内
		(74) 代理人	弁理士 西川 繁明

(54) 【発明の名称】 核酸分離法

(57) 【要約】

【目的】 各種の核酸混合液から数種の特定の一本鎖核酸を一度に分離・回収できる方法を提供すること。

【構成】 分離可能な複数種類の支持体の各々に塩基配列の異なる一本鎖核酸を固定化して成る固定化核酸を試料核酸混合液と接触させて、各固定化核酸と該混合液中のそれらに相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸とでハイブリッドを形成させる核酸分離法。ハイブリッドを形成させた後、各支持体を分離し、ついで前記相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸を分離・回収する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分離可能な複数種類の支持体の各々に塩基配列の異なる一本鎖核酸を固定化して成る固定化核酸を試料核酸混合液と接触させて、各固定化核酸と該混合液中のそれらに相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸とでハイブリッドを形成させることを特徴とする核酸分離法。

【請求項2】 ハイブリッドを形成させた後、各支持体を分離し、ついで前記相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸を分離・回収する請求項1記載の核酸分離法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、各種の核酸を含む混合液から、数種の核酸を同時に分離できる核酸分離法に関する。本発明の核酸分離法は、遺伝子工学の分野において、特に、各種一本鎖DNAの調製や一本鎖DNAライブラリーの作成などに有効である。

【0002】

【従来の技術】 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用ビーズに固定化されたDNAプローブで、試料核酸混合液から1種類の一本鎖DNAを回収し、ついで、この一本鎖DNAの特定領域にプライマーDNAをつけ、DNAポリメラーゼを用いて二本鎖DNAにすることにより、目的遺伝子をクローニングする方法が提案されている（鶴井博理ほか、細胞工学、Vol. 8, No. 7, 1989）。しかしながら、この方法では、一度に1種類の一本鎖DNAしか回収できないこと、二本鎖DNAを作成する際、回収した一本鎖DNAの全領域を二本鎖DNAにできないこと、プライマーDNAの付着点以降しか二本鎖DNAにならないこと、などの問題点がある。

【0003】 また、制限酵素処理等で得られた二本鎖DNA断片をM13ファージベクターにDNAリガーゼを用いて導入し、ついで大腸菌に形質転換した後、M13一本鎖DNA分子の形態でDNAを回収して一本鎖DNAライブラリーとする方法が知られている。しかし、この方法では、使用できるベクターが限られること、ベクターに組み込まれるDNA断片の大きさが限られること、すべてのDNAが大腸菌に形質転換しているか不明なこと、などの問題がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、各種の核酸混合液から数種の特定の本鎖核酸を一度に分離・回収できる方法を提供することにある。本発明者らは、前記従来技術の有する問題点を克服するために鋭意研究した結果、物理的に分離可能な複数種類の支持体であって、各支持体上にそれぞれ塩基配列の異なる一本鎖核酸を固定化したもの（複数種の固定化核酸）を用い、これを試料核酸混合液と接触させて、各支持体上の一本鎖核酸（固定化核酸）と試料溶液中のそれと相補的な塩

基配列を持つ一本鎖核酸（DNA、RNA）とをハイブリダイゼーションさせると、試料核酸混合液から一度に複数的一本鎖核酸が分離できることを見出した。固定化核酸とハイブリッドを形成した試料核酸混合液の一本鎖核酸は、各支持体を分離した後、加熱やアルカリ処理により再び一本鎖核酸として回収することができる。この方法によれば、各支持体に塩基配列の異なる一本鎖核酸を固定化した固定化核酸を用いるため、試料核酸混合液から数種の本鎖核酸を一度に回収することができる。

【0005】 また、試料核酸混合液中の目的の二本鎖DNA断片を2つの一本鎖DNAとしてから、2種類の固定化核酸を用いて、それぞれとハイブリッドを形成させて回収し、ついで回収した2つの一本鎖DNAをアニーリングすれば、目的DNA断片の全領域をカバーした二本鎖DNAを得ることができる。さらに、種々のベクターDNAに特異的な塩基配列を有するDNAを、ベクターDNAの二本鎖のそれぞれについて、プローブDNAとして各支持体に固定化した固定化核酸を用いると、様々なベクターに対して特異的な塩基配列を有する一本鎖DNAライブラリーを作成できるので、ベクターに組み込めるDNA断片の大きさが限定されず、しかも数種のベクターについてDNA断片の導入、大腸菌への形質転換を行なうことで、全てのDNAが形質転換している可能性を高めることができる。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 かくして、本発明によれば、分離可能な複数種類の支持体の各々に塩基配列の異なる一本鎖核酸を固定化して成る固定化核酸を試料核酸混合液と接触させて、各固定化核酸と該混合液中のそれらに相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸とでハイブリッドを形成させることを特徴とする核酸分離法が提供される。ハイブリッドを形成させた後、各支持体を分離し、ついで前記相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸を分離・回収することができる。以下、本発明について詳述する。

【0007】（支持体） 本発明においては、分離可能な複数種類の支持体を用いる。支持体の種類としては、以下のものが例示できる。①天然または合成の有機化合物の膜状のもの。具体例としては、ナイロンメンブラン、ニトロセルロースメンブラン、ポリテトラフルオロエチレンメンブラン、ポリエチレンメンブラン、ポリイソブレンメンブラン、ポリスチレンメンブラン等、天然または合成有機高分子メンブラン（膜状体）を挙げることができる。ニトロセルロースのように、有機高分子（例；セルロース）を化学的に処理し、改質して得たメンブランを含む。同様に、表面を核酸が結合しやすいように、また、使用しやすいように加工（化学的、物理的）したものを含む。

【0008】 ②天然または合成有機化合物の粒子状のもの

3

の。具体例としては、ナイロン、ニトロセルロース、セルロース、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン、ポリイソブレン、ポリスチレン等の有機高分子粒子を挙げることができる。これらの有機高分子粒子は、例えば酸化、還元、加水分解などの化学的処理、あるいは例えばプラズマ照射などの物理的処理で改質したものを含む。

【0009】③無機化合物の膜状のもの。具体例としては、グラファイト、多孔質ガラス、シリカ等の無機高分子メンブラン；アルミニウム、アパタイト等の金属メンブラン；アルミナ、窒化珪素等のセラミックスメンブラン；食塩等の結晶を挙げることができる。さらに、これらの表面を化学的、物理的に表面処理することで改質されたものも使用できる。④無機化合物の粒子状のもの。具体例としては、グラファイト、多孔質ガラス、シリカ等の無機高分子粒子；アルミニウム、アパタイト等の金属粒子；アルミナ等のセラミック粒子；等を挙げることができる。これらの無機化合物粒子は、例えばイオンブレーティングなどの物理的、化学的に表面処理を行なうことで改質されたものも使用できる。⑤ポリアクリルアミド、アガロース等の性状がゲル状のもの。

【0010】これら各種の支持体を分離可能とするには、次のような方法が挙げられる。

i) 比重の異なる支持体を用い、ハイブリダイゼーション後、中間の比重をもつ溶液を加えて、重い支持体と軽い支持体とに分離する方法。

ii) 複数の膜状支持体やそれぞれ粒径の異なる複数種類の粒状支持体、あるいは膜状支持体と粒状支持体との組み合わせなど、形状的に容易に分離可能なものを用いて行なう方法。

iii) 鉄等の磁石（または磁力）により回収できる支持体と、磁石で回収できない支持体を用いて、磁石で分離する方法。

iv) 上記各種方法を適宜組み合わせた方法。

なお、本発明において、複数種類の支持体とは、材質が同じ複数の膜状支持体や材質が同じで粒径の異なる粒状支持体なども包含する。

【0011】（支持体上への核酸の固定化法）支持体に一本鎖核酸（以下、「一本鎖DNA」と略記）を固定化する方法としては、例えば、支持体とDNAの親和力を利用した非特異的吸着による方法、紫外線で活性化した支持体にDNAのアミノ基を共有結合させる方法など各種の方法がある。本発明においては、各支持体上に一本鎖DNAをその末端で固定化したものを使用することが好ましい。一本鎖DNAとしては、その末端に1若しくはそれ以上の余分のヌクレオチド分子を含んでいるか、あるいは一本鎖DNAの末端にあるヌクレオチド分子が化学的修飾を受けているものを用いれば、該余分のヌクレオチドまたは化学的修飾を受けたヌクレオチドを介して支持体上への結合を行なうことができる。以下、支持

体上への一本鎖DNAの固定化法具体例について、順を追って詳細に説明する。

【0012】一本鎖DNAの末端を化学的に修飾する場合

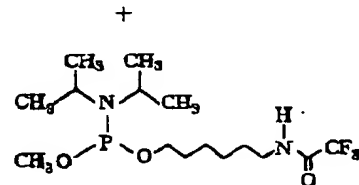
1) まず、末端に固定化に適した官能基（例えば-NH₂、-COOH）を導入した一本鎖DNAを調製する。DNAを合成する場合、その合成自体は、市販のDNA合成装置（例えばApplied Biosystems Inc.（以下、ABI社と略記）製391型PCR-MATEなど）を使用し、常法によって行なうことができる。官能基の導入は、例えば次のような方法で行うことができる。

【0013】① アミノリンク2（ABI社製）の導入以下の反応式にしたがい、DNA合成装置を使って、ヘキシルアミノ基をDNA末端に導入することができる（ABI社のUser Bulletin, No. 49, August 1988, 参照）。

【0014】

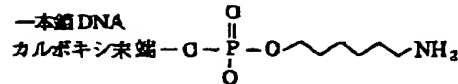
【化1】

一本鎖DNA カルボキシ末端-OH



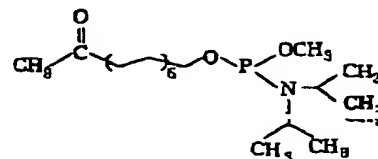
アミノリンク2

↓



【0015】

【化2】



で示されるリンカーを、DNA合成装置（ABI社製、A-391EP PCR-MATEなど）を用いてDNA末端に導入し、これを処理することにより、このリンカー末端を反応性のあるアルデヒド基またはカルボキシ基に導き、さらにアルデヒド基の場合は、ビオチンのヒドラシド化合物と反応させることにより、アビジンと特異的に結合して複合体を形成し得るビオチンを導入することができる（Jonathan N. Krcmsky et al., Nucleic Acid Research 1987, Vol. 15, p. 2891-8）

照)。

【0016】③ DNA合成装置を用い、アミノ基をもつ塩基のヌクレオチド1〜数10個を相補部分のDNA末端に付加する。④ ターミナルトランスフェラーゼにより、支持体との結合に適した塩基、またはその反応性誘導体をDNA末端に導入する(Deug G. and Wu R., *Methods in Enzymology*, Vol. 100, p. 96-116, 1983, 参照)。

【0017】2) 次に、1) で得た一本鎖DNAの相補鎖を1) と同様の合成装置を用いて調製し、両者をアニーリングさせて、二本鎖DNAとする。

3) 上で得た二本鎖DNAを含む溶液に固定化用支持体を加え、両者を結合させる。DNAと支持体との結合方法は、DNAおよび支持体の両者の化学的修飾の種類によって異なり、例えば、次のような各種の方法を用いることができる。

【0018】① DNAまたは支持体上の水酸基(主としてジオール基)をトリフロロエタンスルフォニルクロライド(以下、トレシルクロライドと略記)(K. N. 20 Illison and K. Mosbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102, 449, 1981)、CNBr(R. Axen et al., *Nature*, 214, 1302, 1967)、トリクロロトリアジン(T. H. Finlay et al., *Anal. Biochem.*, 87, 77, 1978)、エピクロロヒドリン(I. Matsumoto et al., *J. Biochem.*, 85, 1091, 1979)、ビスオキシラン(L. Sundberg and J. Porath, 30 *J. Chromatogr.*, 90, 87, 1974)、ジビニルスルホン酸(J. Porath, *Methods in Enzymology*, 34, 27, 1974)、ペンゾキノン(J. Brandt et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, 386, 196, 1975)、カルボニルジイミダゾール(G. S. Bethell et al., *J. Biol. Chem.*, 254, 2572, 1979)などで活性化し、支持体上、またはDNAの主としてアミノ基と結合させる。

【0019】② DNAまたは支持体上の主としてカルボキシル基(−COOH基)を水溶性カルボジイミド等のカルボジイミド(A. Tengblad, *Biochem. J.*, 199, 297, 1981; M. Funabashi et al., *Anal. Biochem.*, 126, 414, 1982)または2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1, 2-ジヒドロキノリン(EDDQ)(G. Saccomani et al., 40 *J. Biochem.*, 256, 12405, 1981; B. Belleuau and G. Ma

lek, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1651, 1968)で活性化し、支持上またはDNAの主としてアミノ基(−NH₂)と縮合結合させる。③ 従来の非特異的または末端とは限らない状態で支持体に結合したDNAに、所望のDNAをDNAリガーゼ(連結酵素)を用いて結合させる。

【0020】④ 支持上およびDNAのヒドラジド基とアルデヒド基、またはヒドラジド基とカルボキシル基を用いて結合させる。ヒドラジド基とアルデヒド基の場合は、混合するとヒドラゾン結合を形成する。これを還元操作を行うと共有結合化する(Jonathan N. Kremsky et al., 上掲文献参照)。ヒドラジドとカルボキシル基の場合は、②のようにカルボジイミド等を用いる。⑤ DNAおよび支持体上に互いに親和力のある物質を導入し(例えば、ビオチンとアビジン)、その親和力に基づいて固定化を行う(Jonathan N. Kremsky et al., 上掲文献参照)。⑥ DNAと支持体上のチオール基どうしを活性化、固定化する(K. Brocklehurst et al., 50 *Biochem. J.*, 133, 573, 1973)。⑦ DNAと支持体上のアミノ基どうしをブリアセタミド法にて結合させる(P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245, 3059, 1970)。

【0021】4) 上で得た固定化二本鎖DNAを2. 4 Mテトラエチルアンモニウムクロライド水溶液、適宜希釈した10×SSC(1. 5M NaClおよび0. 15Mクエン酸ナトリウム; pH7. 0)、0. 1〜2M NaCl水溶液等の塩溶液中、熱(約40℃以上)またはアルカリを加えることにより変性させ、遠心して固相と液相を分離することにより、固定化一本鎖DNAを得る。

【0022】二本鎖DNAをそのまま、あるいは末端を化学的に修飾して用いる場合

二本鎖DNAの一方の鎖に1若しくはそれ以上のヌクレチド分子が付加した形の二本鎖DNAは、そのままあるいは化学的な修飾を施した後支持体に末端で結合させることができるので、上記の工程3) 以降の操作を施せば、上と同様の目的を達成することができる。このような二本鎖DNAは、次のようにして調製することができる。

【0023】① ターミナルトランスフェラーゼを使用して、片方のDNA鎖の末端にのみ支持体との結合に適した塩基またはその反応性誘導体を導入する。②末端に一本鎖部分ができるように制限酵素で切断する。③ 官能基を持つDNA分子と、二本鎖DNAをDNAリガーゼにより結合させる。例えば、二本鎖DNAの両端の切断端が異なる配列を持つように2種の制限酵素で処理する。そこで、一方の切断端に特異的に結合できる配列を有する官能基を有するDNAを加え、そこにDNAリガ

一ゼを作用させることにより目的DNA断片の末端に官能基を導入できる。この場合、除去したい方の鎖の5'末端を脱リン酸化しておいてもよい。即ち、目的とする二本鎖DNAの一端だけが出た長い二本鎖DNAを調製し、この状態で脱リン酸化酵素により5'末端を脱リン酸化し、その後二本鎖DNAを切断して目的断片をつくると一方の5'末端は脱リン酸化されたものができる。

④ 二本鎖DNAの3'末端-OH基にトリクロロトリアジン基を導入することでOH基を活性化する。5'末端-OH基には、③で述べた脱リン酸化を行い-OH基を露出させトリクロロトリアジンを反応させて活性化する。3'末端の-OH基と5'末端の-OH基では、反応性が5'末端の方が良いため、5'末端-OH基を特異的に活性化できる。

【0024】(試料核酸混合液) 試料核酸混合液は、次のような各種の核酸を含有する溶液である。① 細胞から抽出された(天然の) 2本鎖DNA、およびこのDNAを制限酵素や物理的剪断力等で切断したもの、② 天然の1本鎖DNA(上記①のDNAを熱またはアルカリ等で変性させたものを含む)、③ ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR法)等でin vitroで増幅された1本鎖または2本鎖DNA、および該2本鎖DNAを熱またはアルカリ等で変性させたもの、④ 合成DNA、⑤ 天然のRNA、⑥ 合成RNA、⑦ ①~⑥の任意の核酸の混合物。

【0025】(核酸分離法) 本発明の核酸分離法においては、先ず、分離可能な複数種類の支持体の各々に塩基配列の異なる一本鎖核酸を固定化したもの(固定化核酸)を作成する。次いで、この固定化核酸を試料核酸混

①X TGC AGG CAT GCA
② CCA GTG CCA AGC
③X CCA GTA CCA AGC
④ TGC AGG CAT GCA

【0030】上記の各塩基配列は、5'末端から3'末端方向に一本鎖で左から右へ記載した。なお、Xは、ABI社製のアミノリンク2であり、最終段階で5'末端に導入した。1μMスケールで合成し、各DNAは、精製後1.3~1.8mgの範囲で回収された。

【0031】(2)次に、以下の操作により、各支持体上に一本鎖DNA①および③をその末端で固定化した固定化核酸を作成した。

【0032】<固定化DNA(a)>①および②のDNAをそれぞれ100μg分として減圧下で乾固した。次に、①のDNA100μgを1M NaCl(100μl)に溶かし、②のDNA100μgと混合した。この溶液を95℃の水浴上で2分間あたためた後、1時間かけて35℃にまで冷却した。ついで、0.4M NaHCO₃(pH7.5)を100μl加えた。

【0033】これに、後に説明する方法で調製したトリシル活性化シリカゲル20mgを加え、室温で24時間

* 溶液と接触させて、各固定化核酸と該混合液中のそれらに相補的な塩基配列を持つ一本鎖核酸とでそれぞれハイブリッドを形成させる。

【0026】ハイブリダイゼーションは、公知の各種の方法および反応条件を採用することができる。この場合、固定化核酸として、その末端で支持体上に固定化されているものを用いると、固定化によるDNA塩基の破壊がなく、液相中でのDNAとほぼ同じ挙動が期待され、相補的な塩基配列を有する核酸(DNA、RNA)と効率よく、かつ、完全にハイブリッドを形成させることが可能である。したがって、試料核酸混合液から各固定化一本鎖核酸に相補的な塩基配列を有する特定の本鎖核酸をそれぞれ分離することができる。固定化核酸とハイブリッドを形成した試料核酸混合液からの一本鎖核酸は、各支持体を分離した後、常法にしたがって加熱やアルカリ処理することにより再び一本鎖核酸として回収することができる。

【0027】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明についてさらに具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例にのみ限定されるものではない。

【0028】[実施例1]

1. 固定化一本鎖DNAの調製

(1) 以下の塩基配列を有する4種のDNAをDNA合成装置(ABI社の391 EP PCR-MATE)にて合成し、HPLCにて精製することで調製した。

【0029】配列はpUC18ベクターのポリクローニングサイトから25塩基を選んで用いた。

AGC TTG GCA CTG G
TTG CAT GCC TGC A
TTG CAT GCC TGC A
AGC TTG GCA CTG G

反応させた。反応終了後、シリカゲルを1M NaClで3回洗浄し、最後に、1M NaCl 1mlに懸濁した。これを95℃で5分間加熱し、直ちに12000rpmで遠心し、上清を除去し、これを3回繰返して、一本鎖DNA①をシリカゲルに固定化した固定化DNA(a)を得た。

【0034】<固定化DNA(b)>③および④のDNAをそれぞれ100μg分として減圧下で乾固した。次に、③のDNA100μgを1M NaCl 100μlに溶かし、乾固した④のDNA100μgと混合した。これを95℃の水浴上で2分間あたため、1時間かけて35℃に冷却した。これに蒸留水100μlを加えた。また、TOSOH社製CM-5PW30mgを40mg WSC(水溶性カルボジイミド:DOJIN社製)を溶かした500μl HCl水(pH4.0)に加え、4℃で、2時間活性化した。

【0035】その後、蒸留水で3回洗浄し、得たゲルを

前記核酸液と混合し、4℃で、5時間攪拌反応させた。次いで、95℃の水浴で5分間加熱し、直ちに12000rpmで遠心した後、上清を除去し、再び0.5M NaClに懸濁し、加熱(95℃、5分間)、遠心(12000rpm)を3回繰り返して、一本鎖DNA④をCM-5PWに固定化した固定化DNA(b)を得た。

【0036】2. トレシル活性化シリカゲルの調製
以下の操作は、ドライボックスもしくは乾燥窒素を満たした無菌バックなどを適宜利用し、水分の混入を防ぎながら行なった。なお、シリカゲルを単にゲルと略称することがある。

1) アセトン、ピリジンを予めモレキュラーシーブで脱水しておく。

2) 1mlの脱水アセトン、100μlのピリジン、および小さなスターラーチップを10mlのメスフラスコに入れておく。

【0037】3) 1gのゲルをガラスフィルター(#5メッシュ)上でアスピレーターで吸収しながら、アセトン、脱水アセトンで素早く洗浄し、直ちに2)で用意したメスフラスコに入れる。

4) 乾燥窒素で外気が混入しないようにしながら、スターラーでゲルを激しく攪拌しつつ、100~200μl*

pUC18 (Takara 酒造製)	(500μg/ml)	200μl
Eco RI (Takara 酒造製)	(20単位/ml)	20μl
Eco RI 緩衝液 (Takara 酒造製)	(×10倍濃度)	50μl
滅菌蒸留水		230μl

合計 500μl

37℃で1時間反応させた後、0.5M エチレンジアミン四酢酸(EDTA; pH8.0)を10μl加え反応を停止する。

【0040】(2) (1)の反応液に5M酢酸ナトリウム50μlを加え、さらにエタノールを1ml加え、-80℃で20分間放置する。

(3) 4℃、12000rpmで10分間遠心分離する。

(4) 上清を除去し、-20℃で冷却した70%エタノールで沈殿を洗浄し、4℃、12000rpmで30秒間遠心した後、上清を除去する。

(5) デシケーター中で減圧乾燥する。

【0041】(6) 2.4Mテトラエチルアンモニウムクロライド(TEACl)(和光純薬社製)200μlを加え、よく溶かし、75℃、5分間放置する。

(7) 先に調製した2種の固定化DNA(a)および(b)を全量加え、よく攪拌し、20℃で15分間放置する。

(8) 12000rpmで遠心し、上清を別のエッペンドルフチューブに移す。

<20×SSPE溶液>

NaCl	174g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	31.2g

*のトレシルクロライド(Fluka社製)を1分ほどかけて滴下する。この際、氷を詰めたビニール袋などでメスフラスコを0℃付近に保っておく。

5) メスフラスコに蓋をし、ゲルを破砕させないようにスターラーの速度を落とし20分間反応させる。メスフラスコは0℃付近に保っておく。

【0038】6) 反応後、ガラスフィルター上に移し、アセトン、アセトン+5mM HCl(1:1)および5mM HClで洗浄する。

7) さらにアセトンで洗浄し、フィルター上で十分アセトンを揮散させる。

8) ナスフラスコに移し、減圧下にアセトンを揮散させる。トレシルは高温では不安定なので、5)で用いた氷入りビニールなどで低温に保ちつつ乾燥させると、トレシル化シリカゲルが得られる。

【0039】3. サンプルの調製

市販のpUC18DNA(Takara 酒造製)100μgを用い、以下の操作により試料核酸混合液を調製し、固定化DNA(a)および(b)と接触させて、ハイブリダイゼーション処理を行なった。(1)以下の組成の液でDNAを切断する。

(9) 2.4M TEAClを200μl加え、よく攪拌し、12000rpmで、数秒間遠心してゲルを沈殿させ、上清を除去する。

【0042】(10) 2.4M TEAClを200μl加え、そこに比重を1.5に合わせたテトラブromエタン/クロロホルムを300μl加え、6000rpmで数秒間遠心する。

(11) 分離したゲル(各支持体)をそれぞれ回収する。

(12) ゲルを2.4M TEACl 100μlに各々懸濁する。

(13) 70℃で10分間保持し、ハイブリッドしたDNAを液相に溶出させ、液相(サンプルDNA液)を回収する。

【0043】4. 回収DNAの検定

以下の操作により、前項で試料核酸混合液から回収した一本鎖DNAの検定を行なった。

(1) 20×SSPE溶液10mlで濾紙(5.5×5.5cm)を湿らせる。

11

12

EDTA・2Na・2H₂O・

7.4g

を800mlの水に溶かし、NaOHでpH7.4とした後、1リットルにし、オートクレーブ滅菌したもの。

【0044】(2) (1)の濾紙を96穴のミニホールド装置(Bio-Rad社製)に配置する。

(3) 5×5cmのBIODYNEメンブラン(PALL社製)を滅菌水で湿らせた後、20×SSPEに付ける。その後、ミニホールド装置に装着する。

(4) 一度、20×SSPEでミニホールドの各ウェルを洗浄する。

(5) サンプルDNA液を各々2ウェルずつ各5μlずつミニホールドのウェルに加える。

*【0045】(6) 吸引してDNAをメンブランに吸着させる。

(7) メンブランを外し、2回20×SSPEで洗浄する。

(8) 80℃で真空乾燥し、その後、2つに切る(2スポット)。以下、2枚になったメンブランについて、各々以下の処理を行なう。

(9) メンブランを2×SSPEに浸す。

10 【0046】(10) メンブランを0.5mlハイブリダイゼーション液に浸し、65℃で2時間保持する。

<ハイブリダイゼーション液>

20×SSPE	15ml
50×Denhardt's液	2ml
10%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)	2.5ml
10μg/ml サケ精子DNA	0.5ml
滅菌水	30ml
合計	50ml

【0047】(11) 液を捨て、新しく12.5mlの20×に載せる。

ハイブリダイゼーション液を加え、そこに後で述べる一方には(A)、もう一方には(B)の³²PラベルされたDNAプローブを各50μl加えて、65℃で一晩反応させる。

(12) 65℃に保温した0.2×SSPE、0.1% SDS緩衝液で、15分間、4回洗浄する。

(13) メンブランをポリ塩化ビニリデンフィルムの上※

(14) X線フィルムを挟み、-80℃で一晩感光する。

【0048】(15) フィルムを現像し、陽性または陰性を検出する。2つの分画DNAの分析結果は、それぞれの固定化DNAに相補的な塩基配列を有するDNAが回収できていることを示している。

	プローブA	プローブB
シリカゲル分画DNA	+	-
CM-5PW分画DNA	-	+

シグナル

+:陽性

-:陰性

【0049】5. DNAプローブの作製

下記の操作により、DNAプローブ(A)および(B)を作成した。

★(1) 下記⑤と⑥のDNAをABI社製DNA合成装置391 EP PCR-MATEを用いて合成し、AB1社の方法で精製した。

⑤ TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG G

⑥ CCA GTG CCA AGC TTG CAT GCC TGC A

なお、上記の各塩基配列は、5'末端から3'末端方向 40 園水で希釈して10pmole/μlにする。

に一本鎖で左から右へ記載した。

(2) 精製した⑤と⑥のDNAをそれぞれ滅菌水に溶かし、分光光度計で260nmの吸光で濃度を測定し、滅

【0050】(3) 以下の組成の溶液で⑤と⑥の各DNAの5'末端をラベル化(γ-³²Pで標識)する。

DNA(10pmole/μl)	1.0μl
10×バクテリオファージT4ポリヌクレオチド	
キナーゼ緩衝液	2.0μl
[γ- ³² P]ATP(sp.act.5000Ci/mmole;10mCi/ml水溶液)	5.0μl
水	11.0μl
<10×バクテリオファージT4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液>	

13

14

Tris-HCl (pH7.6) 0.5M

MgCl₂

0.1M

ジチオトレイトール (DTT)

50mM

スベルミジンHCl

1mM

EDTA (pH8.0)

1mM

【0051】(4) 8単位のパクテリオフィージT4ポリヌクレオチドキナーゼを加え、37℃で45分間放置する。

(5) 68℃、10分間で反応を停止する。

(6) 40μlの滅菌水を加え、よく混合する。

(7) 240μlの5M酢酸ナトリウムを加え、よく混合する。

(8) 750μlの-20℃エタノールを加え、0℃に30分間放置する。

(9) 0℃、12000rpmで20分間遠心する。

(10) 500μl 80%エタノールを加え、攪拌し、0℃、12000rpmで1分間遠心し、上清を除去する。

【0052】(11) 100μlのTE (pH7.6) 緩衝液を加え、よく溶かす。

<TE>

Tris-HCl (pH7.5) 10mM

EDTA 1mM

液体シンチレーションカウンターで比放射活性を測定すると、2540Ci/mmolであった。このようにして、DNA⑤を標識したDNAプローブ(A)およびDNA⑥を標識したDNAプローブ(B)を作成した。

10 【0053】

【発明の効果】本発明の方法により、一度に様々な種類の一本鎖DNAを簡単に調製でき、一本鎖DNAを用いるサンガー法のDNAシーケンスサンプルの調製に有用である。従来のM13ファージ系でしか作れなかった一本鎖DNAライブラリーをどのようなサイズでもすぐに作れる。しかも、二本鎖DNAのライブラリーから作ることができる。

20 【0054】従来の固定化プローブによるクローニング法と異なり、DNA(核酸)断片全領域をカバーする断片クローニングができる。つまり、目的断片の2本鎖DNAを各々2種の分離可能な固定化プローブで回収した後、アニーリングすることで目的断片全領域を高効率でクローニングできる。